

УДК 616.58/125-84.545

DOI 10.11603/mcch.2410-681X.2016.v0.i4.7268

Т. Я. Ярошенко

ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ І. Я. ГОРБАЧЕВСЬКОГО

ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ ІНГІБІТОРІВ СИНТАЗИ ОКСИДУ АЗОТУ НА ЙОГО СИНТЕЗ У ТКАНИНАХ ЩУРІВ З ТОКСИЧНИМ УРАЖЕННЯМ ПЕЧІНКИ

Вивчено зміни вмісту NO-синтази і продуктів метаболізму оксиду азоту при експериментальному гепатиті на фоні застосування інгібіторів його синтезу. Як показали результати досліджень, використання як неселективного інгібітора L-NAME, так і селективного інгібітора 1400W призводило до зниження в крові й печінці щурів загальної активності NO-синтази та вмісту нітратів і нітритів, які значно зростали внаслідок інтоксикації аліловим спиртом. Було встановлено, що посилена експресія iNOS та гіперпродукція NO при токсичному ураженні печінки відіграють негативну роль, тоді як NO, що синтезується конституційною NOS (зосереджена в основному в ендотелії капілярів), виконує захисну функцію, покращуючи мікроциркуляцію в паренхімі й тим самим мінімізуючи печінкове ураження.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: оксид азоту, індукцйбельна NO-синтаза, N-нітро-L-аргінін, N-(3-(амінометил)бензил)ацетамідин.

ВСТУП. Оксид азоту (NO) впливає на фізіологічні та патологічні процеси в кожному органі й тканині, у тому числі в печінці. Дія NO в печінці є багатовекторною і часто неоднозначною. Оскільки існує взаємозв'язок між продукуванням NO й ураженням гепатоцитів, було проведено ряд досліджень із вивчення ефективності інгібіторів NO-синтази при різних патологічних станах печінки [1]. Пригнічення індукцйбельної NO-синтази мало позитивний ефект при ендотоксемії та ішемії/реперфузії печінки [2, 3]. Вибіркове пригнічення індукцйбельної NO-синтази при токсичному гепатиті позитивно впливало на показники цитолізу й ендогенної інтоксикації [4]. Поєднане застосування при токсичному гепатиті, індукованому аліловим спиртом (АС), 1400W і L-аргініну позитивно впливало на функціональний статус ендогенної антиоксидної системи [5, 6]. Таким чином, інгібітори NO-синтази можуть мати подвійний (позитивний і негативний) ефект щодо гепатотоксичності ксенобіотиків.

Метою даного дослідження було вивчити можливість корекції порушених під впливом АС біохімічних процесів у печінці за допомогою неселективного інгібітора NO-синтази N-нітро-L-аргініну (L-NAME) і селективного інгібітора

індукцйбельної NO-синтази N-(3-(амінометил)бензил)ацетамідину (1400W).

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Досліди проведені на білих щурах-самцях масою 180–200 г, яких утримували у звичайних умовах віварію. Піддослідних тварин було поділено на чотири групи: 1-ша – інтактні; 2-га – контрольні (уражені АС); 3-тя – АС+L-NAME; 4-та – АС+1400W. Аліловий спирт вводили тваринам 2–4 груп у дозі 30 мг/кг маси щура внутрішньочеревно одноразово. Інтактні тварини отримували фізіологічний розчин в ідентичному об'ємі. Неселективний блокатор NO-синтази L-NAME ("Sigma", США) вводили внутрішньочеревно в дозі 10 мг/кг за 30 хв до токсичного ураження і наступного дня після інтоксикації, селективний блокатор iNO-синтази 1400W ("Sigma", США) – одноразово внутрішньочеревно в дозі 1,5 мг/кг за 30 хв до ін'єкції гепатотоксину. Декапітували щурів під тіопенталовим наркозом. Сумарну активність NO-синтази печінки визначали колориметрично за кількістю утворених нітратів і нітритів в інкубаційному середовищі [7]. Кількість утворених нітратів і нітритів визначали, як описано нижче [8].

Статистичну обробку одержаних даних виконували за допомогою програм Origin 7.5

© Т. Я. Ярошенко, 2016.

(OriginLabCorp., США) та Microsoft Excel XP. Порівнювали отримані величини з використанням t-критерію Стюдента, зміни вважали достовірними при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. На рисунку наведено дані, що відображають зміни загальної активності NO-синтази в ураженій АС печінці при застосуванні інгібіторів даного ферменту. Ці результати свідчать про те, що одноразове введення L-NAME перед інтоксикацією щурів АС повністю запобігало активації загальної NO-синтази і навіть призводило до зменшення її активності нижче рівня здорових тварин. Через 24 год після введення токсину й інгібітора активність ферменту була у 2,6 раза нижчою порівняно з тваринами, яким L-NAME не вводили, і на 30 % меншою порівняно з інтактними щурами.

Одноразове застосування селективного інгібітора індукційної NO-синтази 1400W за 30 хв до введення АС також ефективно запобігало підвищенню загальної NO-синтазної активності. Так, показники активності ферменту в групі тварин, яким вводили даний інгібітор, були в 1,9 раза нижчими, ніж у некоригованій групі. Проте, на відміну від L-NAME, 1400W не призводив до зменшення активності NO-синтази нижче за норму.

При дослідженні загальної активності NO-синтази через 72 год після інтоксикації було виявлено, що після застосування неселективного інгібітора даний показник становив 43 % від рівня щурів, яким інгібітор не вводили. Варто відмітити, що у цьому випадку активність ферменту все ще залишалася достовірно нижчою від такої в інтактних тварин.

Після застосування 1400W на 3-тю добу експерименту також спостерігали зниження активності NO-синтази, хоча і не так сильно виражене, як при використанні L-NAME. Так, у цьому випадку досліджуваний показник становив 70 % від рівня щурів, яким корекції не проводили, і достовірно не відрізнявся від такого в інтактних тварин.

Показники вмісту нітратів і нітритів у печінці та плазмі крові щурів з гепатитом, яким вводили інгібітори, позитивно корелювали з показниками загальної активності NO-синтази. Так, через 24 год після застосування L-NAME вміст NO_x в плазмі крові отруєних тварин знизився у 2,8 раза, а в печінці – приблизно вдвічі. В обох випадках це було навіть менше за рівень у здорових щурів. На 3-тю добу експерименту неселективний інгібітор знижував показники вмісту нітратів і нітритів у крові й печінці, відповідно, у 2,1 та 1,4 раза (табл.).

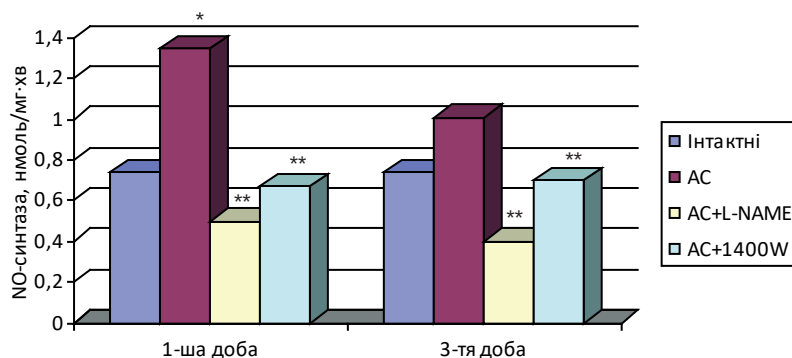


Рис. Активність NO-синтази в печінці інтактних та отруєних АС щурів при дії інгібіторів L-NAME і 1400W ($M \pm m$, $n=10$).

Таблиця – Вміст нітратів і нітритів (NO_x) у плазмі крові й печінці інтактних та отруєних АС щурів при дії інгібіторів L-NAME і 1400W ($M \pm m$, $n=10$)

Група тварин	Показник NO_x	
	плазма, мкмоль/л	печінка, мкмоль/г
Інтактні	$14,30 \pm 1,18$	$2,51 \pm 0,14$
1-ша доба після інтоксикації		
АС	$28,30 \pm 1,14^*$	$3,15 \pm 0,14^*$
АС+L-NAME	$10,32 \pm 1,90^{**}$	$1,55 \pm 0,18^{**}$
АС+1400W	$13,56 \pm 1,63^{**}$	$2,08 \pm 0,19^{**}$
3-тя доба після інтоксикації		
АС	$20,50 \pm 1,06^*$	$2,86 \pm 0,20$
АС+L-NAME	$9,54 \pm 1,02^{**}$	$2,05 \pm 0,14^{**}$
АС+1400W	$14,42 \pm 1,04^{**}$	$2,35 \pm 0,15^{**}$

Примітка. * – зміни достовірні ($p < 0,05$) відносно відповідних показників у групі інтактних тварин; ** – зміни достовірні ($p < 0,05$) відносно відповідних показників у групі контрольних тварин, які отримували аліловий спирт.

Застосування селективного інгібітора 1400W також викликало статистично значуще наближення до норми показників вмісту NO_x у тканинах тварин. Як видно з таблиці, концентрація нітратів і нітритів у плазмі крові щурів, яким вводили інгібітор, на 1-шу добу досліджу була вдвічі вищою порівняно з такою у тварин, яким не проводили корекції, і практично не відрізнялася від норми. У печінці в даний термін дослідження 1400W зменшував вміст в 1,5 раза. Слід зазначити, що в печінці після введення інгібітора концентрація NO_x була на 30 % нижчою від такої у здорових щурів.

На 3-тю добу експерименту після застосування селективного інгібітора вміст нітратів і нітритів у плазмі крові й печінці був нижчим, порівняно з тваринами, яким 1400W не вводили, на 30 і 18 % відповідно. В обох тканинах у цей термін досліджувані показники майже наближалися до норми.

ВИСНОВКИ. Застосування як неселективного інгібітора L-NAME, так і селективного інгібітора 1400W призводить до зменшення в крові й печінці щурів загальної активності NO-синтази та вмісту нітратів і нітритів, які значно зростають внаслідок інтоксикації АС. При цьому L-NAME знижує дані показники більшою мірою, ніж 1400W. В обидва терміни дослідження активність ферменту і вміст NO_x після введення L-NAME нижчі від відповідних показників у здорових тварин. Встановлено, що посилена експресія iNOS та гіперпродукція NO при токсичному ураженні печінки відіграють негативну роль, тоді як NO, що синтезується конституційною NOS (зосереджена в основному в ендотелії капілярів), виконує захисну функцію, покращуючи мікроциркуляцію в паренхімі й тим самим мінімізуючи печінкове ураження.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Iwakiri Y. Nitric oxide in liver diseases / Y. Iwakiri, M. Y. Kim / Trends Pharmacol. Sci. – 2015. – **36**. – P. 524–536. [PMC free article] [PubMed]
2. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase / A. Pautz, J. Art, S. Hahn [et al.] // Nitric Oxide. – 2010. – **23**. – P. 75–93. [PubMed]
3. The role of iNOS in cholesterol-induced liver fibrosis / S. Anavi, M. Eisenberg-Bord, M. Hahn-Obercyger [et al.] // Lab. Invest. – 2015. – **95**. – P. 914–924. [PubMed]
4. Корда М. М. Вплив інгібітора індукційної синтази оксиду азоту N-(3-(Амінометил)бензил)ацетамідину на гепатотоксичність алілового спирту / М. М. Корда, Т. Я. Ярошенко // Мед. хімія. – 2004. – **6**, № 3. – С. 114–116.
5. Yaroshenko T. Role of nitric oxide in chemically induced hepatotoxicity / T. Yaroshenko, M. Korda // Ann. Univers. Mariae Curie-Sklodowska. – 2006. – **19**, № 3. – P. 143–146.
6. Ярошенко Т. Я. Корекція викликаного аліловим спиртом ураження печінки за допомогою поєданого застосування інгібітора індукційної синтази оксиду азоту 1400W і субстрату синтази оксиду азоту L-аргініну / Т. Я. Ярошенко, М. М. Корда // Мед. хімія. – 2007. – **9**, № 4. – С. 24–27.
7. Malinski T. Nitric oxide release from a single cell measured in situ by a porphyrinic based microsensor / T. Malinski, Z. Taha // Nature. – 1992. – № 358. – P. 676–678.
8. Кіселик І. О. Особливості визначення нітратів та нітритів в периферичній крові у хворих на вірусні гепатити та при синдромі жовтяниці іншої етіології / І. О. Кіселик, М. Д. Луцик, Л. Ю. Шевченко // Лаб. діагностика. – 2001. – № 3. – С. 43–45.

Т. Я. Ярошенко

ТЕРНОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И. Я. ГОРБАЧЕВСКОГО

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ИНГИБИТОРОВ СИНТАЗЫ ОКСИДА АЗОТА НА ЕГО СИНТЕЗ В ТКАНЯХ КРЫС С ТОКСИЧЕСКИМ ПОРАЖЕНИЕМ ПЕЧЕНИ

Резюме

Изучено изменения содержания NO-синтазы и продуктов метаболизма оксида азота при экспериментальном гепатите на фоне применения ингибиторов его синтеза. Как показали результаты исследо-

ваний, використання як неселективного інгібітора L-NAME, так і селективного інгібітора 1400W приводило до зниження в крові і печінці крыс загальної активності NO-синтази і вмісту нітратів і нітритів, які значно зростали внаслідок інтоксикації аліловим спиртом. Було встановлено, що посилена експресія iNOS і гіперпродукція NO при токсичному ураженні печінки грають негативну роль, тоді як NO, синтезований конституційною NOS (концентрована в основному в ендотелії капілярів), виконує захисну функцію, покращуючи мікроциркуляцію в паренхімі і тим самим мінімізуючи печінкове ураження.

КЛЮЧЕВІ СЛОВА: оксид азота, індукційна NO-синтаза, N-нітро-L-аргінин, N-(3-(амінометил) бензил)ацетамідин.

T. Ya. Yaroshenko

I. HORBACHEVSKY TERNOPIL STATE MEDICAL UNIVERSITY

STUDY OF INHIBITORS FOR NITRIC OXIDE SYNTHASE ON ITS SYNTHESIS IN TISSUES OF RATS WITH TOXIC LIVER DAMAGE

Summary

There were studied the changes of content of NO-synthase and metabolism products of nitrogen oxide in experimental hepatitis during treatment with inhibitors of its synthesis. According to the results of our research, the use of non-selective inhibitor L-NAME and selective one (1400W) led to decrease of total activity of NO-synthase and content of nitrates and nitrites in the blood and liver of rats, but it's significantly increased as a result of intoxication by allyl alcohol. It was determined that intensive iNOS expression and NO hyper production in toxic hepatitis, plays a negative role, whereas NO, is synthesized with constitutional NOS (generally concentrated in the endothelium of the capillaries) displayed a protective function, by improving microcirculation in the parenchyma and minimizing a toxic hepatitis.

KEY WORDS: nitric oxide, inducible NO-synthase, N-nitro-L-arginine, N-(3-(amynomethyl) benzyl) acetamidine.

Отримано 12.10.16

Адреса для листування: Т. Я. Ярошенко, Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського, м. Воли, 1, Тернопіль, 46001, Україна, e-mail: yaroshenko@tdmu.edu.ua.